

## 短 報

## ゲノムから見た「スズマル」と「スズマル R」の同質性

小木曾映里<sup>1)\*</sup>, 竹内 徹<sup>2)</sup>, 山下陽子<sup>2)</sup>, 黒崎英樹<sup>2)</sup>, 田口文緒<sup>1)</sup>, 羽鹿牧太<sup>1)</sup>

(2019 年 7 月 2 日受付, 2019 年 10 月 21 日受理)

センチュウ抵抗性ダイズ品種「スズマル R」と反復親の「スズマル」の遺伝的背景の同質性確認のため、全ゲノムリシーケンスを行い、塩基配列を比較した。その結果、「スズマル R」に残存する「スズマル」以外のゲノム断片は、シストセンチュウ抵抗性遺伝子を含む 3 箇所と、第 5 染色体末端の 3.6 Mb の小さな断片のみであることがわかった。第 5 染色体の断片は、当初導入が試みられていたダイズわい化病抵抗性遺伝子 (*Rsdv1*) 領域に近接していた。この断片は、選抜の最終段階で不良形質発現のため *Rsdv1* を「スズマル」型に戻した際に近隣領域に残った導入断片であると考えられた。本研究により、全ゲノムリシーケンスによる配列比較により「スズマル」と「スズマル R」の遺伝的背景の高い同質性を明らかにした。全ゲノムリシーケンス解析は、遺伝的背景を詳細に比較可能にする強力なツールであり、DNA マーカーでは検出が困難な小さな導入断片まで特定することで、より精密なピンポイント育種に貢献できると考えられる。

**キーワード：**ダイズ、全ゲノムリシーケンス、戻し交配、マーカー選抜

## 緒 言

「スズマル R」は、ダイズシストセンチュウ (soybean cyst nematode, 以下 SCN) に抵抗性を付与するため、北海道立総合研究機構農業研究本部中央農業試験場 (以下、道総研中央農試) において、SCN 抵抗性遺伝子 *rhg1*, *rhg2*, および *Rhg4* 領域を「スズマル」に導入するために、SCN 抵抗性系統「中交 1900F<sub>1</sub>」を母、「スズマル」を花粉親とした F<sub>1</sub> に、「スズマル」を反復親 (母) として DNA マーカーで SCN 抵抗性遺伝子型を選抜しながら 6 回連続戻し交配を行って育成された (黒崎ら 2017)。「スズマル R」は、*rhg1*, *rhg2*, および *Rhg4* を持ち、北海道の大豆栽培地帯に分布する SCN レース 1 および 3 に対して抵抗性極強であることから、SCN による被害リスクは「スズマル」に比べて格段に低い。また、農業特性および納豆加工適性は「スズマル」とほぼ同等であることが確かめられている。

「スズマル R」の遺伝的背景は、「スズマル」に 6 回戻し交配していることから理論上 99.2% が「スズマル」に置換されていると考えられる。さらに、SCN 抵抗性系統供与親「中交 1900F<sub>1</sub>」は系譜上に「スズマル」を

親として持っており、遺伝的背景の 1/4 は「スズマル」であるため (黒崎ら 2017)、「スズマル R」の遺伝的背景は 99.6% が「スズマル」に置換されていると考えられる。ダイズのゲノムサイズは約 1Gb であることから (Schmutz et al., 2010)、「スズマル R」の「スズマル」に置換されていないゲノム断片領域は総計で 4Mb 程度と推定されるが、一般的に遺伝的背景の調査で用いられる高密度マーカーによるジェノタイプング手法では、このような小さな残存領域すべてを確認することは困難である。本研究では、ゲノムレベルで遺伝的背景の同質性を確認するために、「スズマル」および「スズマル R」の全ゲノムリシーケンスを実施し、配列比較を行うことで DNA マーカーによって選抜された SCN 抵抗性遺伝子以外のゲノム断片が「スズマル」にどの程度残存しているか調査した。

## 材料および方法

「スズマル R」育成時、*rhg1*, *rhg2*, および *Rhg4* 抵抗性遺伝子の供与親として利用されたスズヒメ (*rhg1*, *rhg2*, *Rhg4*: レース 1 抵抗性), ゲデンシラズ (*rhg1g*,

1) 農研機構 次世代作物開発研究センター

2) 北海道立総合研究機構 農業研究本部 中央農業試験場

\* 責任著者: 農研機構 次世代作物開発研究センター畑作物研究領域

〒305-8518 茨城県つくば市観音台 2-1-2 TEL: 029-838-7452 FAX: 029-838-7408

E-mail: demeter@affrc.go.jp

*rhg2g*: レース3抵抗性)の各抵抗性遺伝子型を区別するDNAマーカーとして、1抵抗性につき3つのプライマーを混合しPCRを行うことでPCR産物のサイズの違いから遺伝子型を判定できる共優性マーカーを作成し (Table 1), *rhg1*, *rhg2*, および *Rhg4* を選抜した. (PCR条件は Supplementary information 参照) *Rsdv1* 抵抗性については、初期世代から Sat\_217 および Satt211 (Yamashita et al., 2013) を用いて「中交1900F<sub>1</sub>」型を選抜し、BC<sub>6</sub>F<sub>6</sub> および BC<sub>6</sub>F<sub>7</sub> 世代において *Rsdv1* マーカー (山下ら, 未発表) を用いて「スズマル」型を選抜した.

「スズマル」および「スズマル R」から DNA を抽出し、150 bp ペアエンドで HiSeq X による全ゲノムシーケンスを実施し、ダイズ参照ゲノム配列 (Gmax275[v2.0]) にリードをマッピングし、各種フィルタリングおよび多型検出を行なった (解析の詳細は Supplementary information 参照). 両品種間でホモ多型が見られる合計 12,277 サイトを解析に使用した. 反復親の「スズマル」と「スズマル R」の違いをゲノム断片レベルで検出するために、スライディングウィンドウ解析 (ウィンドウサイズ 500 kbp, スライドサイズ 100 kbp) を行い、多型数が連続して検出される領域を「スズマル」ではない「中交1900F<sub>1</sub>」由来の導入ゲノム断片と判定した. 導入ゲノム断片と DNA マーカーの位置関係を明らかにするために、「スズマル R」の育成時に用いた全マーカーの塩基配列を用いて参照配列 (Gmax189[v1.1] および Gmax275[v2.0]) 上の物理位置を超絶高速ゲノム配列検索 (GGGenome: <https://gggenome.dbcls.jp/>) を用いて明らかにした (Table 1, Supplementary information).

## 結果と考察

「スズマル」および「スズマル R」について得られた全ゲノム配列を比較したところ、両品種間に多型が見られたサイトは 9968 箇所 (SNP: 6820 箇所 InDel: 3148 箇所) であった (Supplementary information Table S2). そのうち 3653 箇所は、1～数塩基レベルの変異を網羅的に収載したデータベース dbSNP に登録されていない多型であった. SCN 抵抗性供与親である「中交1900F<sub>1</sub>」 (黒崎ら 2017) はすでに存在せず、ゲノム配列が不明であるため、スライディングウィンドウ解析によりゲノム上の多型分布を調査することで「スズマル」と「スズマル R」の違いを検出することを試みた. その結果、第5, 8, 11, 18 染色体の4箇所の領域で両品種間の多型が検出された領域が連続しており (Figure 1), これらの4領域は「中交1900F<sub>1</sub>」に由来する「スズマル」とは異なるゲノム断片であると考えられた. 「スズマル R」は、育成時に BC<sub>6</sub>F<sub>1</sub> から BC<sub>6</sub>F<sub>3</sub> 世代で DNA マーカーを用いて抵抗性系統を選抜したのち、BC<sub>6</sub>F<sub>4</sub> 世代で各染色体に配置した 167 個の SSR マーカー (単純反復配列多型: simple sequence repeat marker, 以下 SSR マーカー) を用いて遺伝的背景の調査と選抜を行なっている (Supplementary information Table S1, 黒崎ら 2017). Figure 1 にそれらマーカーの物理位置を示す. 選抜に用いたマーカーは、染色体あたり 5 から 20 個 (平均 8.4 個) で、物理地図上では染色体の比較的末端側にしかマーカーがない染色体も複数あるが、今回の配列レベルの比較によって、マーカーが配置されていない「スズマル R」のゲノム領域に、「スズマル」とは異なるゲノム断片はほぼ存在しないことが

Table 1 DNA selection markers for SCN resistance used in the breeding of Suzumaru R

Gene	Marker	Sequence	Soybean genome version		Accession No. <sup>*3</sup>
			version 1.1 (Gmax189) <sup>*1</sup>	version 2.0 (Gmax275) <sup>*2</sup>	
<i>Rhg4</i>	08g11350	Rhg4-53	CTCCAAACCGTCTACTTC	Chr08: 8280884-8280901	AB495281
		Rhg4-13	CAGTTCACCGGTTCCATA	Chr08: 8281280-8281297	
		Rhg4-52	GGATCATTTCCCTTCCAC	Chr08: 8281582-8281599	
<i>rhg1s</i> <sup>*4</sup>	18g02680s	Rhg1-73	CGGCTGTGTTTTTGGACTTC	Chr18: 1714783-1714802	AB495275
		Rhg1-96	CTTGGAAGTCATTATCTTGGA	Chr18: 1715146-1715166	AB495279
		Rhg1-98	GAGCATCCCAAATTAATGCTATAAAAG	Chr18: 1715459-1715484	Chr18: 1715895-1715920
<i>rhg2g</i> <sup>*5</sup>	11g35710	00010-25	GGTAAGTTTGGTGTGCTGTTC	Chr11: 37334100-37334120	AB506490
		00010-18	ACAAAACAAGCCACGAGC	Chr11: 37333732-37333749	AB506491
		00010-22	CCCAGGTGACTTCCTC	Chr11: 37333471-37333486	Chr11: 32884958-32884973

<sup>\*1</sup> Soybean (Williams 82) published reference genome version 1.1 (Schmutz et al. 2010)

<sup>\*2</sup> Soybean (Williams 82) public reference genome version 2.0 in database (Phytozome)

<sup>\*3</sup> Accession number of the sequence used for marker design.

<sup>\*4</sup> Marker for *rhg1* derived from Suzuhime.

<sup>\*5</sup> Marker for *rhg2* derived from Gedenshirazu.

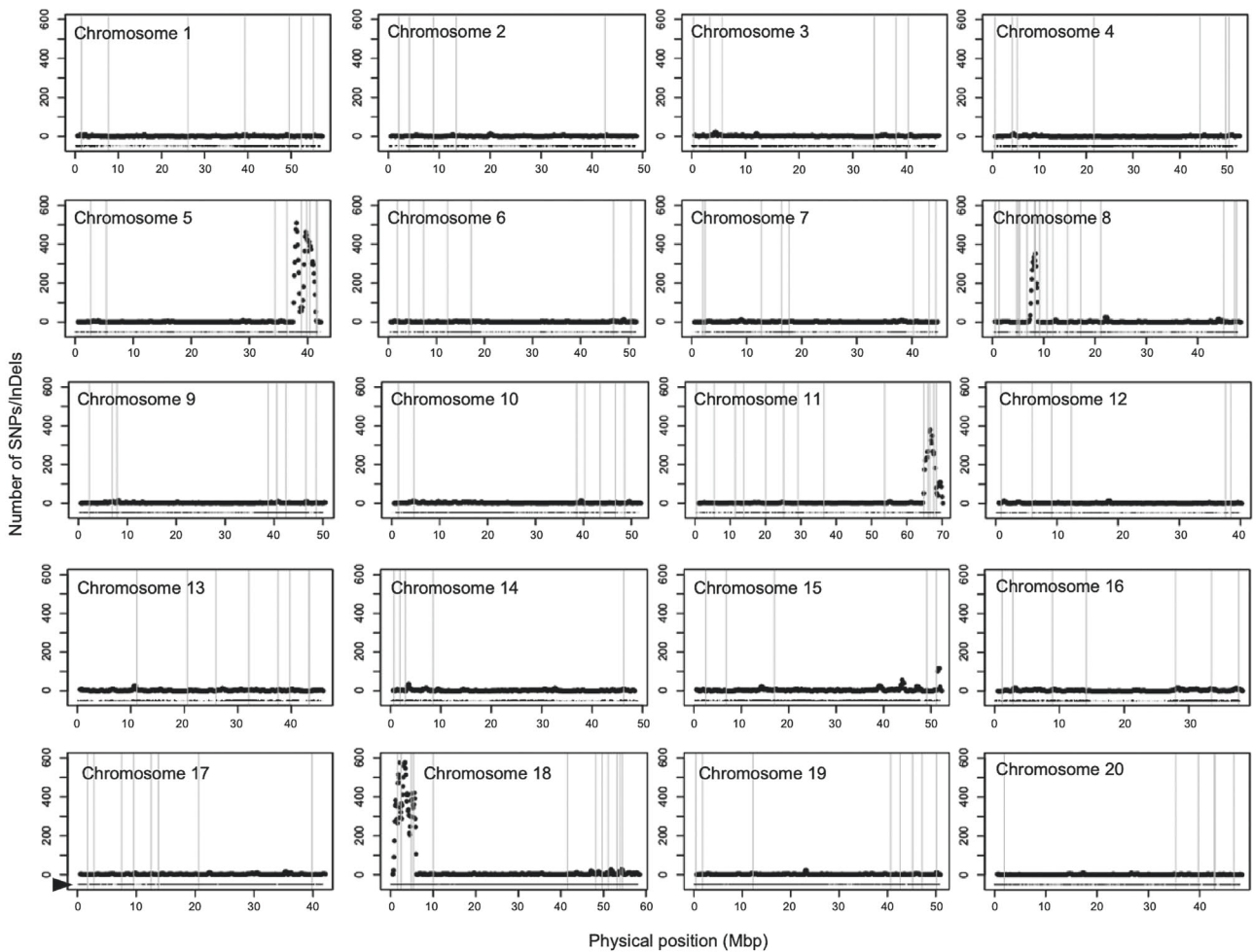


Figure 1 Sliding window haplotype analysis using the chromosomes of Suzumaru and Suzumaru R. The black dots indicate the number of polymorphisms present within a 500-kb region ( $\pm 250$  kb) with a read depth of  $> 5$  and quality score of  $> 100$ . The vertical gray lines indicate the physical position of DNA markers (Supplementary information Table S1) used in marker-assisted selection. The small black dots displayed at the bottom indicate sites with a read depth of  $> 5$  and quality score of  $> 100$ . The reference genome version is 2.0 (Gmax275).

確認できた。マーカー間の物理距離が大きく空いた領域は、組み換え頻度が非常に低いペリセントロメアと呼ばれるヘテロクロマチン構造を持つ領域 (Lin et al. 2005, Walling et al. 2005) と一致しており、ペリセントロメア近傍のマーカーを使用することで、「スズマル R」育成においてペリセントロメアを含む大きなゲノム領域を選抜できていたと考えられる。

次に、「スズマル R」の育成時に DNA マーカーを用いて導入した 3 つの SCN 抵抗性遺伝子のゲノム領域について確認した。「中交 1900F<sub>1</sub>」に由来すると考えられる導入ゲノム断片の 4 箇所のうち、第 8、11、18 染色体で検出された断片はそれぞれ、*Rhg4*、*rhg2* および *rhg1* 領域 (Caldwell et al. 1960, Matson et al. 1965, Meksem et al. 2001) を含んでいた (Figure 2A-C)。第 8 染色体の約 1.5 Mb の導入ゲノム断片は、*Rhg4* 抵抗性領域を挟む Satt315 および Sat\_215 のマーカー間 (Chr08: 6.8-9.2 Mb) で検出された (Figure 2A)。第 11 染色体の約 2.4 Mb の

導入ゲノム断片は、*rhg2* 抵抗性マーカーから約 470 kb 離れた場所に位置する Satt359 から染色体末端 (Chr11: 32.4-34.8 Mb) に検出された (Figure 2B)。第 18 染色体上の約 6 Mb の導入ゲノム断片は、*rhg1* 抵抗性遺伝子を挟む Sat\_210 から Sat\_315 を含む染色体末端 (Chr18: 1.6-5.4 Mb) に検出された (Figure 2C)。いずれの SCN 抵抗性領域も DNA マーカーで選抜された「中交 1900F<sub>1</sub>」に由来すると考えられる抵抗性遺伝子を含む 1 から 6 Mb 程度のゲノム断片が「スズマル R」に導入されていることを確認できた。

SCN 抵抗性遺伝子を含まない領域としては、唯一第 5 染色体に 3.9 Mb (Chr05: 37.6-41.6 Mb) のゲノム断片が検出された。この領域は、ダイズわい化病抵抗性遺伝子 (*Rsdv1*) の非常に近傍に位置していた (Figure 2D)。「スズマル R」が選抜された組合せは、SCN 抵抗性とダイズわい化病抵抗性の両抵抗性を育種目標としていた。そのため、その育成過程において、初期世代から BC<sub>6</sub>F<sub>2</sub> ま

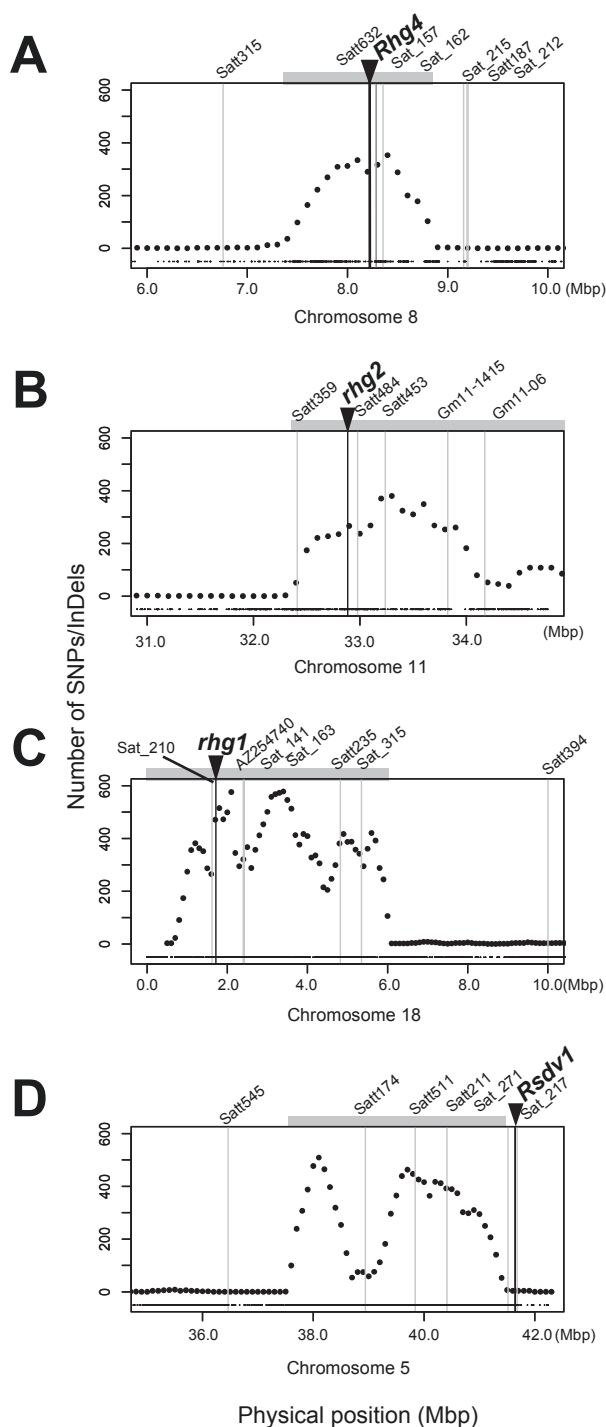


Figure 2 Sliding window haplotype analysis around the regions that were introgressed from the donor line Chukou1900F<sub>1</sub> to Suzumaru background. The gray horizontal bars above each figure indicate the estimated genomic regions from Chukou1900F<sub>1</sub>. The black triangles and vertical lines represent the target gene positions. The name of flanking SSR markers and target genes are shown at the top of each figure.

での間, SCN 抵抗性領域の選抜と同時に「中交 1900F<sub>1</sub>」の *Rsdv1* 領域も選抜対象とし, *Rsdv1* を含む第5染色体の断片がヘテロ型の個体が選抜された(未発表)。しかしながら, 後代の試験で *Rsdv1* を持つ系統に不良形質が見られたため, *Rsdv1* マーカー(山下ら, 未発表)を用いて *Rsdv1* を「スズマル」(感受性)型に固定し「ス

ズマル R」は育成された (Figure 2D)。今回検出された *Rsdv1* に近接した断片は, 固定の際に *Rsdv1* 近傍で組換えが起きたことで「中交 1900F<sub>1</sub>」型に固定した断片であると考えられた。

以上の結果は, 染色体あたり 5 から 20 マーカーを用いて背景選抜することで, 「スズマル R」の遺伝的背景を反復親の「スズマル」の遺伝的背景に置き換えることができたことを示している。ダイズは染色体数が 20 本ある上に, ペリセントロメア領域が非常に大きい特徴があるため, 導入遺伝子の座乗位置によっては目的遺伝子を含む小さなゲノム領域のみを導入することは困難である。しかしながら, ダイズのピンポイント育種は, 戻し交配を 5 回以上繰り返し, その途中で背景選抜を含む DNA マーカー選抜を実施後, 数世代に渡る形質調査と選抜により, 戻し交配親とほぼ同等の性質が得られることが知られている(羽鹿ら 2016, 2019, 高橋ら 2017)。今回の「スズマル」と「スズマル R」の全ゲノムシーケンスによる比較解析によっても, 戻し交配と DNA マーカー選抜により, ピンポイント育種はほぼ達成できているということが確認できた。今後, ピンポイント育種とそれに伴う不良形質の発現について, 選抜の最終段階に全ゲノムシーケンスによる詳細なジェノタイピングを行うことで, 農業形質および不良形質の原因となるゲノム領域や変異を実際の育種過程で捉えることができると期待でき, より高精度なピンポイント育種やピラミディング育種を実現する精密育種 (precision breeding) が可能になると期待される。

## 謝 辞

本研究は農林水産省「革新的技術開発・緊急展開事業」先導プロジェクト(水田作)「海外遺伝資源等を活用した極多収大豆育種素材の開発 A1-(8)」の助成を受けて実施した。解析は農業・食品産業技術総合研究機構高度解析センターの高速演算システムを利用して行った。

## 利益相反の有無

全ての著者は開示すべき利益相反はない

## URLs

dbSNP: [ブラウザ] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/> および [FTP サイト] [ftp://ftp.ncbi.nih.gov/snp/organisms/archive/soybean\\_](ftp://ftp.ncbi.nih.gov/snp/organisms/archive/soybean_)



3847/ (dbSNP は 2018 年 4 月 19 日からヒトの情報に特化するためアーカイブのみ存在。現在は EBI の European Variation Archive [EVA] から最新データを取得可能：[ブラウザ] <https://www.ebi.ac.uk/eva/>)

Supplementary information: [https://github.com/DEMETER298/Suzumaru\\_vs\\_Suzumaru-R](https://github.com/DEMETER298/Suzumaru_vs_Suzumaru-R)

## 引用文献

- 番場宏治, 松川 勲, 谷村吉光, 足立大山, 鈴木和織, 後木利三, 森 義雄, 古川勝弘 (1988) ダイズ新品種「スズマル」の育成について. 北海道立農業試験場集報, 58 : 55-69.
- Caldwell BE, Brim CA and Ross JP (1960) Inheritance of resistance of soybeans to the cyst nematode *Heterodera glycines*. Agronomy Journal 52: 635-636.
- Funatsuki H, Suzuki M, Hirose A, Inaba H, Yamada T, Hajika M, Komatsu K, Katayama T, Sayama T, Ishimoto M and Fujino K (2014) Molecular basis of a shattering resistance boosting global dissemination of soybean. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 111: 17797-17802.
- 羽鹿牧太, 船附秀行, 山田哲也, 高橋浩司, 菱沼亜衣, 平田香里, 大木信彦, 山田直弘 小巻克巳, 松永亮一 (2016) 難裂莢性を導入した大豆新品種「サチユタカ A1 号」の育成. 作物研究所研究報告, 16 : 1-34.
- 羽鹿牧太, 船附秀行, 山田哲也, 高橋浩司, 平田香里, 菱沼亜衣, 大木信彦, 山田直弘, 小巻克巳, 松永亮一 (2019) 難裂莢性を導入した大豆新品種「フクユタカ A1号」の育成. 農研機構研究報告次世代作物開発研究センター 2 : 1-34.
- 黒崎英樹, 藤田正平, 大西志全, 鴻坂扶美子, 田中義則, 竹内徹, 山下陽子, 木口忠彦, 樋浦里志 (2017) ダイズ新品種「スズマル R」の育成. 北海道立総合研究機構農試集報, 101 : 1-13.
- Matson AL and Williams LF (1965) Evidence of fourth genes for resistance to the soybean cyst nematode. Crop Science 5: 477.
- Meksem K, Pantazopoulos P, Njiti VN, Hyten LD, Arelli PR and Lightfoot DA (2001) 'Forrest' resistance to the soybean cyst nematode is bigenic: saturation mapping of the *Rhg1* and *Rhg4* loci. Theoretical Applied Genetics 103: 710-717.
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ, Cheng J, Xu D, Hellsten U, May GD, Yu Y, Sakurai T, Umezawa T, Bhattacharyya MK, Sandhu D, Valliyodan B, Lindquist E, Peto M, Grant D, Shu S, Goodstein D, Barry K, Futrell-Griggs M, Abernathy B, Du J, Tian Z, Zhu L, Gill N, Joshi T, Libault M, Sethuraman A, Zhang XC, Shinozaki K, Nguyen HT, Wing RA, Cregan P, Specht J, Grimwood J, Rokhsar D, Stacey G, Shoemaker RC and Jackson SA (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. Nature 463: 178-183.
- 高橋 幹, 大木信彦, 高橋将一, 小松邦彦, 中澤芳則, 松永亮一 (2017)「フクユタカ」のハスモンヨトウ抵抗性を強化したダイズ品種「フクミノリ」の育成. 九州沖縄農業研究センター報告, 66 : 21-45.
- Yamashita Y, Takeuchi T, Ohnishi S, Sasaki J and Tazawa A (2013) Fine mapping of the major Soybean dwarf virus resistance gene *Rsdv1* of the soybean cultivar 'Wilis'. Breeding Science 63: 417-422.

## Identity of Suzumaru and Suzumaru R Revealed by Whole Genome Sequencing

Eri OGISO-TANAKA <sup>1)</sup>\*, Toru TAKEUCHI <sup>2)</sup>, Yoko YAMASHITA <sup>2)</sup>, Hideki KUROSAKI <sup>2)</sup>,  
Fumio TAGUCHI-SHIOBARA <sup>1)</sup> and Makita HAJIKA <sup>1)</sup>

(Received: Jul. 2, 2019/ Accepted: Oct. 21, 2019)

### Summary

Suzumaru R was developed by introducing three resistant genes against soybean cyst nematode, namely, *rhg1*, *rhg2*, and *Rhg4* into Suzumaru by backcrossing six times and marker-assisted selection. In the present study, we performed whole genome re-sequencing of the soybean varieties Suzumaru and Suzumaru R and compared the sequence for isogeneity confirmation of the genetic backgrounds of the varieties. At the genome level, Suzumaru and Suzumaru R were found to have the same genetic background, using a sliding window analysis, except for three fragments, each of which contained *rhg1*, *rhg2*, or *Rhg4*, and a 3.6-Mb fragment at the end of chromosome 5. In the breeding process, the end of chromosome 5 was intentionally selected for soybean dwarf virus resistance (*Rsdv1*) from the donor parent in the BC<sub>6</sub>F<sub>1</sub> to BC<sub>6</sub>F<sub>4</sub> generation. However, plants having *Rsdv1* showed unfavorable traits, and therefore, plants that did not have *Rsdv1* were selected eventually. This small fragment on chromosome 5 might be a remnant region. Thus, whole-genome re-sequencing can be a powerful tool for in-depth analyses of the difference between two varieties. Applying this technology to backcross breeding would enable “precision breeding.”

**Keywords:** Soybean, Whole genome re-sequence, Backcross, Marker-assisted selection

---

1) Institute of Crop Science, NARO

2) Agricultural Research Department Central Agricultural Experiment station, Hokkaido Research Organization

\* Corresponding author: Division of Field Crop Research, Institute of Crop Science, NARO,

2-1-2, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8518, Japan. Tel: 029-838-7452 FAX: 029-838-7408

E-mail: demeter@affrc.go.jp